PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 20 April 2000 (20.04.00)	
International application No.: PCT/EP99/07394	Applicant's or agent's file reference: 5159/00/WO
International filing date: 05 October 1999 (05.10.99)	Priority date: 08 October 1998 (08.10.98)
Applicant: WEISHEIT, Ralph et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

[X] in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

09 February 2000 (09.02.00)

[ ] in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election [X] was

[ ] was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

09/807079

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	**WEITERES VORGEHEN**	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
5159/00/WO		
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum *(Tag/Monat/Jahr)*	(Frühestes) Prioritätsdatum *(Tag/Monat/Jahr)*
PCT/EP 99/07394	05/10/1999	08/10/1998
Anmelder		
ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

[X] Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. **Grundlage des Berichts**

   a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

   [ ] Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

   b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

   [ ] in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

   [ ] zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

   [ ] bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

   [ ] bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

   [ ] Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

   [ ] Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. [ ] **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. [ ] **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

   [X] wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

   [ ] wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

   [X] wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

   [ ] wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. --

   [ ] wie vom Anmelder vorgeschlagen

   [ ] weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

   [ ] weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

   [ ] keine der Abb.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/07394

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/42

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DE 196 28 484 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH.) 22. Januar 1998 (1998-01-22) Zusammenfassung; Ansprüche ---	1-11
Y	DE 196 22 090 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH.) 4. Dezember 1997 (1997-12-04) das ganze Dokument & WO 97 45733 A in der Anmeldung erwähnt --- -/--	1-11

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
28. Januar 2000	11/02/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Griffith, G

1

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/07394

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	B. HAHN ET AL.: "Polychromatic analysis: New applications of an old technique." CLINICAL CHEMISTRY., Bd. 25, Nr. 6, Juni 1979 (1979-06), Seiten 951-959, XP002129120 AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY. WINSTON., US ISSN: 0009-9147 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-11
Y	D. W. JAY ET AL.: "Characterization and mathematical correction of hemolysis interference in selected Hitachi 717 assays." CLINICAL CHEMISTRY., Bd. 39, Nr. 9, September 1993 (1993-09), Seiten 1804-1810, XP002129121 AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY. WINSTON., US ISSN: 0009-9147 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-11
Y	US 5 766 872 A (R. L. CYBULSKI.) 16. Juni 1998 (1998-06-16) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-11
Y	WO 97 45728 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH.) 4. Dezember 1997 (1997-12-04) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-11

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 99/07394

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19628484 A	22-01-1998	CA 2261285 A	22-01-1998
		WO 9802570 A	22-01-1998
		EP 0923649 A	23-06-1999
DE 19622090 A	04-12-1997	AU 3093597 A	05-01-1998
		CN 1216614 A	12-05-1999
		CZ 9803895 A	14-07-1999
		WO 9745733 A	04-12-1997
		EP 0906570 A	07-04-1999
		JP 11510902 T	21-09-1999
		NZ 331491 A	29-04-1999
		PL 330220 A	10-05-1999
US 5766872 A	16-06-1998	NONE	
WO 9745728 A	04-12-1997	DE 19622091 A	08-01-1998
		AU 3171797 A	05-01-1998
		CN 1214770 A	21-04-1999
		CZ 9800271 A	15-07-1998
		EP 0906567 A	07-04-1999
		HU 9900723 A	28-07-1999
		PL 330221 A	10-05-1999

09/807079

T18

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

REC'D 18 AUG 2000
WIPO PCT

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	**WEITERES VORGEHEN** siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
5159/00/WO		
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum *(Tag/Monat/Jahr)*	Prioritätsdatum *(Tag/Monat/Tag)*
PCT/EP99/07394	05/10/1999	08/10/1998
Internationale Patentklassification (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/42		
Anmelder ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

   ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

   Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

   - I ☒ Grundlage des Berichts
   - II ☐ Priorität
   - III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
   - IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
   - V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
   - VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
   - VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
   - VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags	Datum der Fertigstellung dieses Berichts
09/02/2000	16.08.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde: Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Maucher, C Tel. Nr. +49 89 2399 7415

Formblatt PCT/IPEA/409 (Deckblatt) (Januar 1994)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07394

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-3,5-13	ursprüngliche Fassung				
4,4a	eingegangen am	14/07/2000	mit Schreiben vom	12/07/2000

Patentansprüche, Nr.:

1-11	ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja:	Ansprüche	1-11
	Nein:	Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja:	Ansprüche	1-11
	Nein:	Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja:	Ansprüche	1-11
	Nein:	Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

Punkt V:

Die Argumente des Anmelders wurden beim Verfassen dieses Bescheides berücksichtigt.

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: DE-A-196 28 484
D3: CLINICAL CHEMISTRY,
Bd. 39, Nr. 9, 1993, Seiten 1804-1810

1. Artikel 33(2) PCT

Der Gegenstand von Anspruch 1-11 ist neu (Artikel 33(2) PCT) gegenüber dem Stand der Technik, da ein Verfahren zur Bestimmung alkalischer Phosphatase offenbart wird, in dem eine neue Kombination von Haupt-und Nebenmeßwellenlängen benutzt wird.

2. Artikel 33(3) PCT

2.1. Die **Ansprüche 1-11** sind aus folgenden Gründen erfinderisch (Artikel 33(3) PCT) gegenüber D1 und D3:

Der Gegenstand der Ansprüche 1-11 unterscheidet sich vom nächsten Stand der Technik D1 dadurch, daß neben der Hauptmeßwellenlänge von 450 +/- 10nm "als Nebenmeßwellenlänge mindestens eine der Wellenlängen 480 +/- 10nm, 546 +/- 10nm oder 575 +/- 10nm verwendet" wird.

Die spezielle Kombination der beanspruchten Wellenlängen hat den überraschenden Effekt gegenüber dem Stand der Technik, daß sich bei der Bestimmung alkalischer Phosphatase die Verwendung von Peroxidase zur Beseitigung von Störungen durch freies Hämoglobin erübrigt.

Diese Auswahl der Wellenlängen und der damit verbundene Effekt ist aus D1 und D3 nicht naheliegend:

D1 offenbart vielmehr Bereiche starker Absorption von Hämoglobin, d.h. Bereiche großer Störung durch Hämoglobin, in denen auch die beanspruchten Bereiche liegen: 380-450nm oder/und 520-590nm (Seite 2, Zeilen 13-16, Zeilen 57-58). D3 offenbart Absorptionsmaxima bei ca. 540 und 575nm für Hämoglobin. Das Problem der Entstörung wird in beiden Dokumenten ausschließlich mit Hilfe von Peroxiden gelöst (D1, Anspruch 6, D3: Zusammenfassung).

Punkt VIII:

Die Ansprüche 1 und 10 wurden zwar als getrennte, unabhängige Ansprüche abgefaßt, sie scheinen sich aber tatsächlich auf ein und denselben Gegenstand zu beziehen und unterscheiden sich voneinander offensichtlich nur durch voneinander abweichende Definitionen des Gegenstandes, für den Schutz begehrt wird. Somit sind die Ansprüche nicht knapp gefaßt.

Aus diesem Grund erfüllen die Ansprüche 1 und 10 nicht die Erfordernisse des Artikels 6 PCT.

Fall von enzymatischen Farbtests wie beispielsweise zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase, bei denen die Hauptmeßwellenlänge im Bereich von 415 nm liegt, nicht möglich.

Im US-Patent 5,766,872 wird erwähnt, daß bei der Amylase-Bestimmung die Nebenwellenlänge von 577 nm zu einer Verringerung der Hämolysestörung führt. Aus den angeführten Meßdaten ist jedoch zu erkennen, daß bereits bei einem Hb-Gehalt von 500 mg/dl eine signifikante Meßwertabweichung von bis zu 8 % vorliegt. Das reicht zwar für die Hämolyse-Entstörung, doch ist aufgrund der verwendeten Hauptmeßwellenlänge von ca. 415 nm zu erwarten, daß bei höherem Hb-Gehalt (wie er bei einer Therapie mit Blutersatzmitteln auftritt) diese Meßwertabweichung ebenfalls größer wird und eine ausreichende Hb-Entstörung dann nicht mehr gegeben ist.

In der DE-A-196 28 484 wird ein Verfahren zur Beseitigung von Störungen, die durch die Anwesenheit von freiem Hämoglobin hervorgerufen werden, beschrieben. Die Hämoglobin-Störung bei Photometrischen Messungen wie beispielsweise der Bestimmung von alkalischer Phosphatase wird dadurch beseitigt, dass der zu vermessenen Probe peroxidische Verbindungen zugesetzt werden. Dadurch kommt es zu einer raschen Ausbleichung der vom Hämoglobin verursachten Färbung und Wegfall der damit verbundenen spektralen Störungen. Die Messung der mit Peroxid behandelten Probe erfolgt bei Wellenlängen von etwa 380-450nm und/oder 520-590nm. Die Bestimmung von alkalischer Phosphatase ohne Peroxid-Behandlung wird weder offenbart noch nahegelegt.

Im Stand der Technik ist kein Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase ohne Peroxid-Zugabe bekannt, das auch in Anwesenheit von hohen Hb-Konzentrationen, wie sie beispielsweise in Blutersatzmittel enthaltenden Proben vorkommen, störungsfrei durchgeführt werden kann.

Aufgabe war es daher, ein verbessertes Verfahren zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase in einer Probe zu entwickeln, das die Nachteile des Standes der Technik weitgehend überwindet. Insbesondere sollte ein einfaches und anwenderfreundliches Verfahren

zur Beseitigung von Störungen durch Hämoglobin und auf Hämoglobin basierenden Blutersatzmitteln bei der Bestimmung der alkalischen Phosphatase bereitgestellt werden.

Gelöst wird die Aufgabe durch das in den Ansprüchen näher definierte Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase in einer Probe durch optische Messung. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man eine Hauptmeßwellenlänge von 450 ± 10 nm und als Nebenmeßwellenlänge mindestens eine der Wellenlängen 480 ± 10 nm, 546 ± 10 nm oder 575 ± 10 nm verwendet. Bevorzugt wird nur eine der genannten Nebenmeßwellenlängen verwendet.

09/807679
Translation

RECEIVED
SEP 14 2001
TECH CENTER 1600/2900

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 5159/00/WO	**FOR FURTHER ACTION**	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/EP99/07394	International filing date (*day/month/year*) 05 October 1999 (05.10.99)	Priority date (*day/month/year*) 08 October 1998 (08.10.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/42		
Applicant ROCHE DIAGNOSTICS GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 2 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 09 February 2000 (09.02.00)	Date of completion of this report 16 August 2000 (16.08.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP99/07394

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-3,5-13, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages 4,4a, filed with the letter of 12 July 2000 (12.07.2000),
pages _____, filed with the letter of _____.

☒ the claims, Nos. 1-11, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. _____, filed with the letter of _____,
Nos. _____, filed with the letter of _____.

☐ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____
☐ the claims, Nos. _____
☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The applicant's arguments have been considered when establishing this report.

This report makes reference to the following documents:

D1: DE-A-196 28 484

D2: CLINICAL CHEMISTRY,
Vol. 39, No. 9, 1993, pages 1804-1810.

1. PCT Article 33(2)

The subject matter of Claims 1-11 is novel (PCT Article 33(2)) over the prior art because it concerns a method for detecting alkaline phosphatase using a novel combination of main and secondary measuring wavelengths.

2. PCT Article 33(3)

2.1 **Claims 1-11** are inventive (PCT Article 33(3)) in relation to D1 and D3 for the following reasons:

The subject matter of Claims 1-11 differs from the closest prior art document D1 in that "at least one of the wavelengths 480 +/- 10nm, 546 +/- 10 nm or

575 +/n 10 nm is used as a secondary measuring wavelength" besides the main measuring wavelength of 450 +/- 10 nm.

The surprising effect in relation to the prior art of the special combination of the claimed wavelengths is that the use of peroxidase for suppressing interference caused by free haemoglobin can be dispensed with for detecting alkaline phosphatase.

This selection of wavelengths and its concomitant effect is not obvious from D1 and D3.

D1 rather discloses strong haemoglobin absorption ranges, that is ranges in which haemoglobin has a strong interference effect, and in which the claimed ranges also lie: 380-450 nm or/and 520-590 nm (page 2, lines 13-16 and 57-58). D3 discloses absorption peaks at about 540 and 575 nm for haemoglobin. The problem of interference suppression is solved in both documents only by the use of peroxides (Claim 6 of D1 and the abstract of D3).

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Claims 1 and 10 are drafted as separate independent claims. However, they seem to relate to the same subject matter, the only apparent difference being in the definition of the subject matter for which protection is sought. The claims are therefore not concise.

For this reason, Claims 1 and 10 do not meet the requirements of PCT Article 6.

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation [7]: C12Q 1/42

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 00/22162**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. April 2000 (20.04.00)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/07394

(22) Internationales Anmeldedatum: 5. Oktober 1999 (05.10.99)

(30) Prioritätsdaten:
198 46 301.4 8. Oktober 1998 (08.10.98) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; D–68298 Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: WEISHEIT, Ralph [DE/DE]; Meisenweg 4, D–82380 Peissenberg (DE). TREIBER, Wolfgang [DE/DE]; Andreas–Schmidtner–Strasse 20a, D–82362 Weilheim (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH; Patentabteilung, D–68298 Mannheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING ALKALINE PHOSPHATASE AND ELIMINATING HAEMOGLOBIN DISTURBANCES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON ALKALISCHER PHOSPHATASE UNTER BESEITIGUNG VON HÄMOGLOBIN–STÖRUNGEN

(57) Abstract

The invention relates to a method for determining alkaline phosphatase in a sample by means of optical measurement and eliminating disturbances caused by free haemoglobin or blood substitutes by using certain wavelength combinations. The invention also relates to a method for eliminating the disturbances that are caused by free haemoglobin or blood substitutes during the determination of alkaline phosphatase and to the use of certain wavelength combinations for eliminating disturbances caused by free haemoglobin or blood substitutes.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase in einer Probe durch optische Messung, bei dem Störungen durch freies Hämoglobin oder Blutersatzmittel mittels bestimmter Wellenlängenkombinationen beseitigt werden, eine Methode zur Beseitigung von Störungen, die durch freies Hämoglobin oder Blutersatzmittel bei der Bestimmung von alkalischer Phosphatase hervorgerufen werden, sowie die Verwendung bestimmter Wellenlängenkombinationen zur Beseitigung von Störungen durch freies Hämoglobin oder Blutersatzmittel.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	**ES**	Spanien	**LS**	Lesotho	**SI**	Slowenien
AM	Armenien	**FI**	Finnland	**LT**	Litauen	**SK**	Slowakei
AT	Österreich	**FR**	Frankreich	**LU**	Luxemburg	**SN**	Senegal
AU	Australien	**GA**	Gabun	**LV**	Lettland	**SZ**	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MC**	Monaco	**TD**	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	**GE**	Georgien	**MD**	Republik Moldau	**TG**	Togo
BB	Barbados	**GH**	Ghana	**MG**	Madagaskar	**TJ**	Tadschikistan
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**MK**	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	**TM**	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland			**TR**	Türkei
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**ML**	Mali	**TT**	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	**IE**	Irland	**MN**	Mongolei	**UA**	Ukraine
BR	Brasilien	**IL**	Israel	**MR**	Mauretanien	**UG**	Uganda
BY	Belarus	**IS**	Island	**MW**	Malawi	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	**IT**	Italien	**MX**	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	**JP**	Japan	**NE**	Niger	**UZ**	Usbekistan
CG	Kongo	**KE**	Kenia	**NL**	Niederlande	**VN**	Vietnam
CH	Schweiz	**KG**	Kirgisistan	**NO**	Norwegen	**YU**	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**NZ**	Neuseeland	**ZW**	Zimbabwe
CM	Kamerun			**PL**	Polen		
CN	China	**KR**	Republik Korea	**PT**	Portugal		
CU	Kuba	**KZ**	Kasachstan	**RO**	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	**LC**	St. Lucia	**RU**	Russische Föderation		
DE	Deutschland	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Sudan		
DK	Dänemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Schweden		
EE	Estland	**LR**	Liberia	**SG**	Singapur		

Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase unter Beseitigung von Hämoglobin-Störungen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase in einer Probe durch optische Messung, bei dem Störungen durch freies Hämoglobin oder Blutersatzmittel mittels bestimmter Wellenlängenkombinationen beseitigt werden, eine Methode zur Beseitigung von Störungen, die durch freies Hämoglobin oder Blutersatzmittel bei der Bestimmung von alkalischer Phosphatase hervorgerufen werden, sowie die Verwendung bestimmter Wellenlängenkombinationen zur Beseitigung von Störungen durch freies Hämoglobin oder Blutersatzmittel.

Es ist bekannt, daß durch Hämolyse diagnostische Verfahren zur Bestimmung von Analyten teilweise erheblich gestört werden. Unter Hämolyse wird jegliche Zerstörung von Erythrocyten beispielsweise durch mechanische, osmotische, chemische oder enzymatische Einwirkung auf die Zellmembran der Erythrocyten verstanden. Infolge der Hämolyse tritt der Blutfarbstoff Hämoglobin (Hb) aus und ist aus einer Probe nicht mehr zu entfernen. Problematisch ist die Anwesenheit von Hämoglobin zum einen aufgrund des mit den Spektren der nachzuweisenden Substanzen und Indikatoren (Chromogenen) zum Teil erheblich überlappenden Absorptionsspektrums von Hämoglobin, wodurch es zu Fehlmessungen in photometrischen Tests kommen kann. Zum anderen kann Hämoglobin auch mit Probenbestandteilen chemisch reagieren, wodurch ebenfalls Substanzen entstehen, die Fehlmessungen erzeugen können.

In letzter Zeit sind für Therapiezwecke beispielsweise nach hohem Blutverlust immer häufiger Blutersatzmittel im Einsatz, die auf Basis von Hämoglobin hergestellt werden. Das Hämoglobin in Blutersatzmitteln kann nativer, oder synthetischer Natur sein. Oftmals werden auch Hb-analoge Verbindungen eingesetzt. Im Gegensatz zur Hämolyse ist bei einer Therapie mit Blutersatzmitteln mit einem Hb-Gehalt im Blutserum bzw. -plasma von mehr

als 2000 mg/dl zu rechnen. Störungen in Proben, die Blutersatzmittel enthalten, sind daher oftmals wesentlich ausgeprägter als in hämolytischen Proben. da das Hämoglobin oder das synthetische Analogon von vornherein in freier Form vorliegt.

Besonders gravierend ist der Störeinfluß von freiem Hämoglobin bei der photometrischen Bestimmung von alkalischer Phosphatase. Bei der Bestimmung der alkalischen Phosphatase wird die Bildung von 4-Nitrophenol bei 415 nm gemessen (Extinktionszunahme). Hämoglobin absorbiert ebenfalls bei 415 nm. In Gegenwart von Hämoglobin wird die Bestimmung der alkalischen Phosphatase in zweierlei Hinsicht gestört: Zum einen ändert sich im alkalischen Milieu das Hb-Spektrum zeitabhängig (Extinktionsabnahme), zum anderen wird ab einem bestimmten Hb-Gehalt die Photometergrenze des Meßgerätes erreicht.

Zur Beseitigung spektraler und chemischer Einflüsse von Hämoglobin auf die Analyse von Serum- oder Plasmaproben sind im Stand der Technik unterschiedliche Verfahren publiziert.

Wegen der einfachen Handhabung bei automatisierten Analysengeräten wird neben der ersten Meßwellenlänge (Hauptwellenlänge) häufig eine zweite Meßwellenlänge (Nebenwellenlänge) benutzt, mittels derer der Störeinfluß interferierender Substanzen wie Hämoglobin, Bilirubin und Lipämie beseitigt oder zumindest minimiert werden kann. In Clin Chem 25/6, 951-959 (1979) verweisen Hahn et al. darauf, daß die Nebenwellenlänge so zu wählen ist, daß diese nahe des Absorptionsminimums des Chromogens und nahe des Absorptionsmaximums der Störsubstanz liegen sollte. Die Bestimmung von alkalischer Phosphatase kann jedoch mit den hier angegebenen Meßverfahren nicht entstört werden.

Jay und Provasek beschreiben in Clin Chem 39/9, 1804-1810 (1993), daß die Hämoglobinstörung bei der Bestimmung von alkalischer Phosphatase durch eine zeitabhängige Änderung des Hb-Spektrums verursacht wird. Diese Störung kann durch mathematische Korrekturalgorithmen (Bestimmung der Hb-Konzentration in der Probe und Korrektur des gemessenen Wertes für alkalische Phosphatase um einen bestimmten Betrag, der der gemessenen Hb-Menge äquivalent ist) beseitigt werden.

Die von Jay und Provasek erwähnte mathematische Korrektur beseitigt zwar den Hb-Einfluß bis mindestens 800 mg/dl Hb, ist jedoch wenig anwenderfreundlich, da sie eine zusätzliche Messung des Hb-Gehaltes voraussetzt und anschließend noch einen mathematischen Korrekturschritt erfordert.

Jay und Provasek (supra) beschreiben eine weitere Methode zur Entstörung durch sogenannte Rate-Blank-Messung. Die Korrektur von Hämolyse-Störungen durch Rate-Blank-Messungen ist auch in der EP-A-0 695 805 beschrieben. Hier wird vor der eigentlichen photometrischen Bestimmung einer in der Probe enthaltenen Komponente die Probe einer Vorreaktion unterworfen, durch die der Hämolysegrad der Probe bestimmt wird. Der nachfolgend erhaltene Meßwert wird dann korrigiert um einen Wert, der durch Korrelation des Hämolysegrades mit dem Meßfehlerbeitrag von störenden Komponenten ermittelt wurde.

Durch Rate-Blank-Messungen kann die Hb-Störung beseitigt werden, allerdings nur bis zu einem Hb-Gehalt von ca. 1200 mg/dl, da bei höherem Hb-Gehalt die Photometergrenze erreicht wird. Dies kann zwar ausreichend für die Beseitigung von Hämolysestörungen sein, ist jedoch keinesfalls ausreichend für die Beseitigung von Blutersatzmittel-Störungen.

Eine weitere Möglichkeit zur Beseitigung von Hämoglobinstörungen wurde für die Bestimmung von Albumin publiziert (PCT-Anmeldung WO 97/45728), wo durch spezielle Kombinationen von Haupt- und Nebenwellenlängen eine Beseitigung von Hämoglobinstörungen erzielt werden konnte. Die hier genannten Wellenlängenkombinationen können jedoch nicht für die Bestimmung der alkalischen Phosphatase verwendet werden, da bei diesen Wellenlängen kein Meßsignal mehr für 4-Nitrophenol erhalten wird.

Die Offenlegungsschrift WO 97/45733 beschreibt, daß mit den Nebenwellenlängen 546 und 570 nm bei einzelnen UV-Tests die Störungen durch Hämoglobin beseitigt werden können. Dieses Verfahren ist jedoch nur auf enzymatische UV-Tests mit einer Hauptmeßwellenlänge von 340 nm anwendbar. Während hierbei eine vollständige Hb-Entstörung allein durch die Nebenwellenlängen 546 bzw. 570 nm erreicht werden kann, ist dies im

Fall von enzymatischen Farbtests wie beispielsweise zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase, bei denen die Hauptmeßwellenlänge im Bereich von 415 nm liegt, nicht möglich.

Im US-Patent 5,766,872 wird erwähnt, daß bei der Amylase-Bestimmung die Nebenwellenlänge von 577 nm zu einer Verringerung der Hämolysestörung führt. Aus den angeführten Meßdaten ist jedoch zu erkennen, daß bereits bei einem Hb-Gehalt von 500 mg/dl eine signifikante Meßwertabweichung von bis zu 8 % vorliegt. Das reicht zwar für die Hämolyse-Entstörung, doch ist aufgrund der verwendeten Hauptmeßwellenlänge von ca. 415 nm zu erwarten, daß bei höherem Hb-Gehalt (wie er bei einer Therapie mit Blutersatzmitteln auftritt) diese Meßwertabweichung ebenfalls größer wird und eine ausreichende Hb-Entstörung dann nicht mehr gegeben ist.

Im Stand der Technik ist kein Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase bekannt, das auch in Anwesenheit von hohen Hb-Konzentrationen, wie sie beispielsweise in Blutersatzmittel enthaltenden Proben vorkommen, störungsfrei durchgeführt werden kann.

Aufgabe war es daher, ein verbessertes Verfahren zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase in einer Probe zu entwickeln, das die Nachteile des Standes der Technik weitgehend überwindet. Insbesondere sollte ein einfaches und anwenderfreundliches Verfahren zur Beseitigung von Störungen durch Hämoglobin und auf Hämoglobin basierenden Blutersatzmitteln bei der Bestimmung der alkalischen Phosphatase bereitgestellt werden.

Gelöst wird die Aufgabe durch das in den Ansprüchen näher definierte Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase in einer Probe durch optische Messung. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man eine Hauptmeßwellenlänge von 450 ± 10 nm und als Nebenmeßwellenlänge mindestens eine der Wellenlängen 480 ± 10 nm, 546 ± 10 nm oder 575 ± 10 nm verwendet. Bevorzugt wird nur eine der genannten Nebenmeßwellenlängen verwendet.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß eine effektive Hb-Entstörung für die Bestimmung der alkalischen Phosphatase dann möglich ist, wenn zum einen die Hauptwellenlänge und zusätzlich dazu auch die Nebenwellenlänge geändert wird. Für eine zufriedenstellende Hb-Entstörung ist es nicht ausreichend, nur die Hauptwellenlänge oder nur die Nebenwellenlänge zu ändern.

Aufgrund des Absorptionsspektrums von 4-Nitrophenol kann die alkalische Phosphatase nicht nur bei 415 nm gemessen werden, sondern auch bei 450 ± 10 nm. Zwar befindet sich damit die Hauptmeßwellenlänge nicht im üblicherweise verwendeten Absorptionsmaximum der Nachweisreaktion, sondern an dessen Flanke, aber das erhaltene Meßsignal ist dennoch ausreichend für die exakte Bestimmung der alkalischen Phosphatase.

Bereits durch Wahl der neuen Hauptmeßwellenlänge 450 ± 10 nm kommt es zu einer leichten Verringerung der Hämoglobin-Störung, aber eine vollständige Entstörung erhält man überraschenderweise erst durch die Kombination der Hauptwellenlänge 450 ± 10 nm mit mindestens einer der Nebenwellenlängen 480 ± 10 nm, 546 ± 10 nm oder 575 ± 10 nm. Als besonders geeignet hat sich eine Nebenwellenlänge von 570 nm erwiesen. Insbesondere für die Bestimmung der alkalischen Phosphatase nach der IFCC-Methode hat sich die Nebenwellenlänge 480 ± 10 nm zur Hb-Entstörung als gut geeignet erwiesen (Beispiel 2).

Andere Nebenwellenlängen wie beispielsweise 340, 376, 505, 600, 660 und 700 nm haben sich zur Hämoglobin-Entstörung als nicht geeignet erwiesen.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es erstmals auf einfache Weise möglich, die durch Hämoglobin bzw. Hb-analoge Verbindungen verursachten Störungen bei der Bestimmung von alkalischer Phosphatase bis zu einem Hb-Gehalt von mind. 3000 mg/dl zu beseitigen. Die Obergrenze zur Beseitigung der Hb-Störungen liegt bei der durch die Leistungsfähigkeit des verwendeten Photometers bestimmten Grenze. Bis zu 6500 mg/dl Hämoglobin-Gehalt ist daher eine gute Entstörung durch das erfindungsgemäße Verfahren denkbar. Die Erfindung ist weiterhin für die verschiedenen Reagenzien zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase anwendbar, wie aus den Beispielen 1 bis 3 ersichtlich ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich zur Bestimmung beliebiger Proben, in denen freies Hämoglobin vorliegt. Der Begriff "freies Hämoglobin" im Sinne der Erfindung wird in Abgrenzung zu solchem Hämoglobin verwendet, das in intakten Erythrocyten enthalten ist. Beispiele für Proben, die freies Hämoglobin enthalten, sind hämolytische Serum- oder Plasmaproben oder Proben, die Blutersatzmittel enthalten. Beispiele für Blutersatzmittel, die im Sinne der vorliegenden Erfindung unter den Begriff "freies Hämoglobin" fallen, sind derivatisierte, polymerisierte, modifizierte oder quervernetzte Derivate von Hämoglobinen, insbesondere von Humanhämoglobin oder Rinderhämoglobin, z. B. DCL-Hämoglobin (Diaspirin-crosslinked Hämoglobin), sowie rekombinant hergestelltes Hämoglobin.

Ebenfalls ein Gegenstand der Erfindung ist eine Methode zur Beseitigung von Störungen, die durch freies Hämoglobin hervorgerufen werden, in einem Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase. Die Methode ist dadurch gekennzeichnet, daß man eine Hauptmeßwellenlänge von 450 ± 10 nm und als Nebenmeßwellenlänge mindestens eine der Wellenlängen 480 ± 10 nm, 546 ± 10 nm oder 575 ± 10 nm verwendet.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer Hauptmeßwellenlänge von 450 ± 10 nm in Kombination mit mindestens einer der Nebenmeßwellenlängen 480 ± 10 nm, 546 ± 10 nm oder 575 ± 10 nm zur Beseitigung von Störungen durch freies Hämoglobin oder durch auf Hämoglobinbasis hergestellte Blutersatzmittel in einem Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase.

Die Erfindung wird durch nachfolgende Beispiele erläutert:

Beispiele

Allgemeine Methoden:

Ein Teil eines Serumpools wurde mit einer Hb-haltigen Lösung derart versetzt, daß ein Hb-Gehalt von mindestens 3000 mg/dl erreicht wurde. Ein anderer gleichgroßer Teil desselben Serumpools wurde mit der äquivalenten Menge NaCl-Lösung (154 mmol/l) versetzt. Beide Teile wurden anschließend in unterschiedlichem Verhältnis derart miteinander vermischt, daß eine Hb-Konzentrationsreihe aus 11 Proben erhalten wird, deren niedrigste Probe kein Hb und deren höchste Probe mindestens 3000 mg/dl Hb enthält.

Beispiel 1

Bestimmung der Alkalischen Phosphatase nach der SFBC-Methode

Bestimmung nach Empfehlungen der Société Française de Biologie Clinique gemäß Ann. Biol. Clin. Vol 35, 271 (1977)

Die Bestimmung wurde an einem Boehringer Mannheim/Hitachi 911-Analysengerät durchgeführt.

Es wurden folgende Reagenzien verwendet:

Reagenz 1: 930 mmol/l 2-Amino-2-methyl-1-propanol-Puffer, pH 10.5; 1,03 mmol/l Magnesiumaspartat

Reagenz 2: 930 mmol/l 2-Amino-2-methyl-1-propanol-Puffer, pH 10.5; 1,03 mmol/l Magnesiumaspartat; 98 mmol/l 4-Nitrophenylphosphat

Die Testdurchführung war wie folgt: Zu 11 µl Probe wurden 250 µl Reagenz 1 und nach 5 min 50 µl Reagenz 2 gegeben. Die Bestimmung des Analyten erfolgte nach einer Dauer von weiteren 50 sec über einen Zeitraum von 4 min, wobei die Extinktionsänderung während dieser 4 min gemessen wurde. Zur Messung wurden Kombinationen folgender Hauptmeßwellenlängen (λ_1) und Nebenmeßwellenlängen (λ_2) verwendet: λ_1/λ_2 = 415/546 nm, 415/570 nm, 415/660 nm und 450/660 nm (Vergleich) sowie 450/546 nm und 450/570 nm (Erfindung).

Als weiterer Vergleich wurde die Bestimmung der Alkalischen Phosphatase nach der von Jay und Provasek erwähnten Rate-Blank-Messung durchgeführt (als "415/660 nm RB" bezeichnet).

Das Ergebnis ist in Tabelle 1 gezeigt. Es ist zu erkennen, daß bei Verwendung der erfindungsgemäßen Meßwellenlängenkombinationen von 450/546 nm bzw. 450/570 nm der Hämoglobin-Einfluß im Vergleich zu den anderen Meßwellenlängenkombinationen bzw. zur Rate-Blank-Messung signifikant reduziert wird.

Tabelle 1

Gemessener Gehalt an Alkalischer Phosphatase bei 37°C in U/l

Hb-Gehalt* [mg/dl]	415/546 nm	415/570 nm	415/660 nm	415/660 nm RB	450/660 nm	450/546 nm	450/570 nm
0	42	42	42	42	42	41	42
300	33	32	32	44	35	40	41
600	24	24	22	46	29	40	40
900	16	16	14	46	24	39	41
1200	11	11	8	44	22	40	40
1500	7	7	3	5	19	40	40
1800	2	2	-2	0	17	39	40
2100	3	3	-2	0	17	40	41
2400	3	3	-2	1	15	43	42
2700	4	3	-1	0	16	42	43
3000	4	3	-2	1	19	45	45

* hier wurde ein vernetztes Hämoglobin eingesetzt

Beispiel 2

Bestimmung der Alkalischen Phosphatase nach der IFCC-Methode

Bestimmung nach Empfehlungen der International Federation of Clinical Chemistry gemäß J. Clin. Chem. Clin. Biochem. Vol 21, 731-748 (1983)

Die Bestimmung wurde an einem Boehringer Mannheim/Hitachi 911-Analysengerät durchgeführt.

Es wurden folgende Reagenzien verwendet:

Reagenz 1: 360 mmol/l 2-Amino-2-methyl-1-propanol-Puffer, pH 10,4 (30°C);
2,04 mmol/l Magnesiumacetat; 1,02 mmol/l Zinksulfat;
2,04 mmol/l N-(2-Hydroxyethyl)-ethylendiamintriessigsäure)

Reagenz 2: 360 mmol/l 2-Amino-2-methyl-1-propanol-Puffer, pH 10,4 (30°C);
2,04 mmol/l Magnesiumacetat; 1,02 mmol/l Zinksulfat;
2,04 mmol/l N-(2-Hydroxyethyl)-ethylendiamintriessigsäure)
104 mmol/l 4-Nitrophenylphosphat

Die Testdurchführung war wie folgt: Zu 7 µl Probe wurden 250 µl Reagenz 1 und nach 5 min 60 µl Reagenz 2 gegeben. Die Bestimmung des Analyten erfolgte nach einer Dauer von weiteren 50 sec über einen Zeitraum von 4 min, wobei die Extinktionsänderung während dieser 4 min gemessen wurde. Zur Messung wurden Kombinationen folgender Hauptmeßwellenlängen (λ_1) und Nebenmeßwellenlängen (λ_2) verwendet: λ_1/λ_2 = 415/700 nm (Vergleich) sowie 450/480 nm (Erfindung).

Das Ergebnis ist in Tabelle 2 gezeigt. Es ist zu erkennen, daß bei Verwendung der erfindungsgemäßen Meßwellenlängenkombination von 450/480 nm der Hämoglobin-Einfluß im Vergleich zur bisherigen Meßwellenlängenkombination 415/700 nm signifikant reduziert wird und auch bei sehr hohem Hb-Gehalt keine negativen Werte auftreten.

Tabelle 2

Gemessener Gehalt an Alkalischer Phosphatase bei 37°C in U/l

Hb-Gehalt* [mg/dl]	415/700 nm	450/480 nm
0	167	170
300	157	164
600	152	160
900	145	157
1200	139	154
1500	133	151
1800	126	149
2100	123	150
2400	116	153
2700	-4,3	154
3000	-4,4	153

* hier wurde ein rekombinant hergestelltes Hämoglobin eingesetzt

Beispiel 3

Bestimmung der Alkalischen Phosphatase nach der DGKC-Methode

Bestimmung nach Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie gemäß Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. Vol 10, 290 (1972)

Die Bestimmung wurde an einem Boehringer Mannheim/Hitachi 911-Analysengerät durchgeführt.

Es wurden folgende Reagenzien verwendet:

Reagenz 1: 1,02 mmol/l Diäthanolamin-Puffer, pH 9,8; 0,51 mmol/l Magnesiumchlorid

Reagenz 2: 1,02 mmol/l Diäthanolamin-Puffer, pH 9,8; 0,51 mmol/l Magnesiumchlorid; 61 mmol/l 4-Nitrophenylphosphat

Die Testdurchführung war wie folgt: Zu 4 µl Probe wurden 250 µl Reagenz 1 und nach 5 min 50 µl Reagenz 2 gegeben. Die Bestimmung des Analyten erfolgte nach einer Dauer von weiteren 50 sec über einen Zeitraum von 4 min, wobei die Extinktionsänderung während dieser 4 min gemessen wurde. Zur Messung wurden Kombinationen folgender Hauptmeßwellenlängen (λ_1) und Nebenmeßwellenlängen (λ_2) verwendet: λ_1/λ_2 = 415/700 nm (Vergleich) sowie 450/546 nm (Erfindung).

Das Ergebnis ist in Tabelle 3 gezeigt. Es ist zu erkennen, daß bei Verwendung der erfindungsgemäßen Meßwellenlängenkombination von 450/546 nm der Hämoglobin-Einfluß im Vergleich zur bisherigen Meßwellenlängenkombination 415/700 nm signifikant reduziert wird und auch bei sehr hohem Hb-Gehalt keine negativen Werte auftreten.

Tabelle 3

Gemessener Gehalt an Alkalischer Phosphatase bei 37°C in U/l

Hb-Gehalt* [mg/dl]	415/700 nm	450/546 nm
0	287	298
650	226	279
1300	172	277
1950	119	278
2600	65	278
3250	20	278
3900	-25	280
4550	-65	284
5200	-100	286
5850	-13	286
6500	-15	302

* hier wurde ein polymerisiertes Hämoglobin eingesetzt

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase in einer Probe durch optische Messung dadurch gekennzeichnet, daß man eine Hauptmeßwellenlänge von 450 ± 10 nm und als Nebenmeßwellenlänge mindestens eine der Wellenlängen 480 ± 10 nm, 546 ± 10 nm oder 575 ± 10 nm verwendet.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als Nebenmeßwellenlänge 480 ± 10 nm verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als Nebenmeßwellenlänge 546 ± 10 nm verwendet.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als Nebenmeßwellenlänge 575 ± 10 nm verwendet.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als Nebenmeßwellenlänge 570 nm verwendet

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung in einer Serum- oder Plasmaprobe durchgeführt wird.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Probe bestimmt, die freies Hämoglobin oder ein auf Hämoglobinbasis hergestelltes Blutersatzmittel enthält.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Blutersatzmittel ein derivatisiertes, polymerisiertes, modifiziertes oder quervernetztes Humanhämoglobin, Rinderhämoglobin oder ein rekombinant hergestelltes Hämoglobin enthält.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe einen Hämoglobingehalt bis zu 6500 mg/dl aufweist.

10. Methode zur Beseitigung von Störungen, die durch freies Hämoglobin oder Blutersatzmittel hervorgerufen werden, in einem Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase dadurch gekennzeichnet, daß man eine Hauptmeßwellenlänge von 450 ± 10 nm und als Nebenmeßwellenlänge mindestens eine der Wellenlängen 480 ± 10 nm, 546 ± 10 nm oder 575 ± 10 nm verwendet.

11. Verwendung einer Hauptmeßwellenlänge von 450 ± 10 nm in Kombination mit mindestens einer der Nebenmeßwellenlängen 480 ± 10 nm, 546 ± 10 nm oder 575 ± 10 nm zur Beseitigung von Störungen durch freies Hämoglobin oder Blutersatzmittel in einem Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In: onal Application No
PCT/EP 99/07394

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE 196 28 484 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH.) 22 January 1998 (1998-01-22) abstract; claims	1-11
Y	DE 196 22 090 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH.) 4 December 1997 (1997-12-04) the whole document & WO 97 45733 A cited in the application	1-11

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 January 2000	11/02/2000

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Griffith, G

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In ional Application No
PCT/EP 99/07394

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	B. HAHN ET AL.: "Polychromatic analysis: New applications of an old technique." CLINICAL CHEMISTRY., vol. 25, no. 6, June 1979 (1979-06), pages 951-959, XP002129120 AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY. WINSTON., US ISSN: 0009-9147 cited in the application the whole document	1-11
Y	D. W. JAY ET AL.: "Characterization and mathematical correction of hemolysis interference in selected Hitachi 717 assays." CLINICAL CHEMISTRY., vol. 39, no. 9, September 1993 (1993-09), pages 1804-1810, XP002129121 AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY. WINSTON., US ISSN: 0009-9147 cited in the application the whole document	1-11
Y	US 5 766 872 A (R. L. CYBULSKI.) 16 June 1998 (1998-06-16) cited in the application the whole document	1-11
Y	WO 97 45728 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH.) 4 December 1997 (1997-12-04) cited in the application the whole document	1-11

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. ional Application No
PCT/EP 99/07394

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19628484 A	22-01-1998	CA 2261285 A	22-01-1998
		WO 9802570 A	22-01-1998
		EP 0923649 A	23-06-1999
DE 19622090 A	04-12-1997	AU 3093597 A	05-01-1998
		CN 1216614 A	12-05-1999
		CZ 9803895 A	14-07-1999
		WO 9745733 A	04-12-1997
		EP 0906570 A	07-04-1999
		JP 11510902 T	21-09-1999
		NZ 331491 A	29-04-1999
		PL 330220 A	10-05-1999
US 5766872 A	16-06-1998	NONE	
WO 9745728 A	04-12-1997	DE 19622091 A	08-01-1998
		AU 3171797 A	05-01-1998
		CN 1214770 A	21-04-1999
		CZ 9800271 A	15-07-1998
		EP 0906567 A	07-04-1999
		HU 9900723 A	28-07-1999
		PL 330221 A	10-05-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int onales Aktenzeichen
PCT/EP 99/07394

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/42

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DE 196 28 484 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH.) 22. Januar 1998 (1998-01-22) Zusammenfassung; Ansprüche ---	1-11
Y	DE 196 22 090 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH.) 4. Dezember 1997 (1997-12-04) das ganze Dokument & WO 97 45733 A in der Anmeldung erwähnt --- -/--	1-11

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
28. Januar 2000	11/02/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Griffith, G

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Ir tionales Aktenzeichen
PCT/EP 99/07394

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	B. HAHN ET AL.: "Polychromatic analysis: New applications of an old technique." CLINICAL CHEMISTRY., Bd. 25, Nr. 6, Juni 1979 (1979-06), Seiten 951-959, XP002129120 AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY. WINSTON., US ISSN: 0009-9147 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-11
Y	D. W. JAY ET AL.: "Characterization and mathematical correction of hemolysis interference in selected Hitachi 717 assays." CLINICAL CHEMISTRY., Bd. 39, Nr. 9, September 1993 (1993-09), Seiten 1804-1810, XP002129121 AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY. WINSTON., US ISSN: 0009-9147 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-11
Y	US 5 766 872 A (R. L. CYBULSKI.) 16. Juni 1998 (1998-06-16) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-11
Y	WO 97 45728 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH.) 4. Dezember 1997 (1997-12-04) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-11

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Ir. onales Aktenzeichen
PCT/EP 99/07394

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19628484 A	22-01-1998	CA 2261285 A	22-01-1998
		WO 9802570 A	22-01-1998
		EP 0923649 A	23-06-1999
DE 19622090 A	04-12-1997	AU 3093597 A	05-01-1998
		CN 1216614 A	12-05-1999
		CZ 9803895 A	14-07-1999
		WO 9745733 A	04-12-1997
		EP 0906570 A	07-04-1999
		JP 11510902 T	21-09-1999
		NZ 331491 A	29-04-1999
		PL 330220 A	10-05-1999
US 5766872 A	16-06-1998	KEINE	
WO 9745728 A	04-12-1997	DE 19622091 A	08-01-1998
		AU 3171797 A	05-01-1998
		CN 1214770 A	21-04-1999
		CZ 9800271 A	15-07-1998
		EP 0906567 A	07-04-1999
		HU 9900723 A	28-07-1999
		PL 330221 A	10-05-1999

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

09/807079

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS ODER DER ERKLÄRUNG

(Regel 44.1 PCT)

An
ROCHE DIAGNOSTICS GMBH
- Patentabteilung
D-68298 Mannheim
GERMANY

K	Roche Diagnostics GmbH Patentabteilung					Ab	
Jg						Hil	
Si	14. Feb. 2000					Wu	
Kn	16.2.					Pa	
P	Kö	Kil	S	Sz	im	Wb	

FK: Dr. Weisheit 2d 162. Ed

Absendedatum (Tag/Monat/Jahr)	11/02/2000
Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts: 5159/00/WO - Ku	WEITERES VORGEHEN: siehe Punkte 1 und 4 unten
Internationales Aktenzeichen: PCT/EP 99/07394	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr): 05/10/1999
Anmelder: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.	

1. [X] Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.

Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:
Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

Wo sind Änderungen einzureichen?

Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20, Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

2. [ ] Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a) übermittelt wird.

3. [ ] **Hinsichtlich des Widerspruchs** gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß

[ ] der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungsämter dem Internationalen Büro übermittelt worden sind.

[ ] noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.

4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:

Kurz nach Ablauf von **18 Monaten** seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90bis.1 bzw. 90bis.3 vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

Innerhalb von **19 Monaten** seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.

Innerhalb von **20 Monaten** seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungsämtern vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswahlerklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Jaap Hurenkamp

Formblatt PCT/ISA/220 (Juli 1998) *(Siehe Anmerkungen auf Beiblatt)*

Se T: 11.04.00 aOK. Se T. Sv. sl.

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen.
Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Anspruche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der Internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen, die anderen Ansprüche nicht neu numeriert zu werden. Im Fall einer Neunumerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu numerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der dieinternationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

BNSDOCID: <XSISA220NODEP4_1_>

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (Fortsetzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

i) der Anspruch unverändert ist;

ii) der Anspruch gestrichen worden ist;

iii) der Anspruch neu ist;

iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;

v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:
"Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."

2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:
"Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."

3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]:
Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt."Oder" Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."

4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]:
"Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

"Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigefügt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 62.2 a), erster Satz).

Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amts sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

BNSDOCID: <XISISA220NODEP4_1_>

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
5159/00/WO		
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum *(Tag/Monat/Jahr)*	(Frühestes) Prioritätsdatum *(Tag/Monat/Jahr)*
PCT/EP 99/07394	05/10/1999	08/10/1998
Anmelder		
ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

[X] Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. **Grundlage des Berichts**

   a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

   [ ] Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

   b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

   [ ] in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

   [ ] zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

   [ ] bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

   [ ] bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

   [ ] Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

   [ ] Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. [ ] **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. [ ] **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

   [X] wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

   [ ] wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

   [X] wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

   [ ] wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. —

   [ ] wie vom Anmelder vorgeschlagen

   [ ] weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

   [ ] weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

   [ ] keine der Abb.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/07394

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/42

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DE 196 28 484 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH.) 22. Januar 1998 (1998-01-22) Zusammenfassung; Ansprüche	1-11
Y	DE 196 22 090 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH.) 4. Dezember 1997 (1997-12-04) das ganze Dokument & WO 97 45733 A in der Anmeldung erwähnt	1-11

-/—

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
28. Januar 2000	11/02/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31–70) 340–3016	Griffith, G

1

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/07394

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	B. HAHN ET AL.: "Polychromatic analysis: New applications of an old technique." CLINICAL CHEMISTRY., Bd. 25, Nr. 6, Juni 1979 (1979-06), Seiten 951-959, XP002129120 AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY. WINSTON., US ISSN: 0009-9147 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-11
Y	D. W. JAY ET AL.: "Characterization and mathematical correction of hemolysis interference in selected Hitachi 717 assays." CLINICAL CHEMISTRY., Bd. 39, Nr. 9, September 1993 (1993-09), Seiten 1804-1810, XP002129121 AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY. WINSTON., US ISSN: 0009-9147 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-11
Y	US 5 766 872 A (R. L. CYBULSKI.) 16. Juni 1998 (1998-06-16) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-11
Y	WO 97 45728 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH.) 4. Dezember 1997 (1997-12-04) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-11

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/07394

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19628484 A	22-01-1998	CA 2261285 A	22-01-1998
		WO 9802570 A	22-01-1998
		EP 0923649 A	23-06-1999
DE 19622090 A	04-12-1997	AU 3093597 A	05-01-1998
		CN 1216614 A	12-05-1999
		CZ 9803895 A	14-07-1999
		WO 9745733 A	04-12-1997
		EP 0906570 A	07-04-1999
		JP 11510902 T	21-09-1999
		NZ 331491 A	29-04-1999
		PL 330220 A	10-05-1999
US 5766872 A	16-06-1998	KEINE	
WO 9745728 A	04-12-1997	DE 19622091 A	08-01-1998
		AU 3171797 A	05-01-1998
		CN 1214770 A	21-04-1999
		CZ 9800271 A	15-07-1998
		EP 0906567 A	07-04-1999
		HU 9900723 A	28-07-1999
		PL 330221 A	10-05-1999

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

09/807079

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

FK: Dr. Weisheit

An:

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH
- Patentabteilung -
D-68298 Mannheim
ALLEMAGNE

K	Roche Diagnostics GmbH Patentabteilung					AB
JG						HIL
SI	17. Aug. 2000					WN
Kn	Erl.					RA
P	KÖ	KIL	S	SZ	IM	WB

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNGSBERICHTS

(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum *(Tag/Monat/Jahr)*	16.08.2000
Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts: 5159/00/WO-	**WICHTIGE MITTEILUNG**

Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum *(Tag/Monat/Jahr)*	Prioritätsdatum *(Tag/Monat/Jahr)*
PCT/EP99/07394	05/10/1999	08/10/1998

Anmelder: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.

2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.

3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amts wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. **ERINNERUNG**

   Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

   Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

   Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde

Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Danti, B

Tel. +49 89 2399-8161

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	**WEITERES VORGEHEN**	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
5159/00/WO		
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum *(Tag/Monat/Jahr)*	Prioritätsdatum *(Tag/Monat/Tag)*
PCT/EP99/07394	05/10/1999	08/10/1998
Internationale Patentklassification (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK		
C12Q1/42		
Anmelder		
ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

   ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

   Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

   - I ☒ Grundlage des Berichts
   - II ☐ Priorität
   - III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
   - IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
   - V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
   - VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
   - VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
   - VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags	Datum der Fertigstellung dieses Berichts
09/02/2000	16.08.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Maucher, C Tel. Nr. +49 89 2399 7415

Formblatt PCT/IPEA/409 (Deckblatt) (Januar 1994)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07394

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-3,5-13	ursprüngliche Fassung				
4,4a	eingegangen am	14/07/2000	mit Schreiben vom	12/07/2000

Patentansprüche, Nr.:

1-11	ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

   ☐ Beschreibung, Seiten:
   ☐ Ansprüche, Nr.:
   ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja:	Ansprüche	1-11
	Nein:	Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja:	Ansprüche	1-11
	Nein:	Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja:	Ansprüche	1-11
	Nein:	Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

Punkt V:

Die Argumente des Anmelders wurden beim Verfassen dieses Bescheides berücksichtigt.

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: DE-A-196 28 484
D3: CLINICAL CHEMISTRY,
Bd. 39, Nr. 9, 1993, Seiten 1804-1810

1. Artikel 33(2) PCT

Der Gegenstand von Anspruch 1-11 ist neu (Artikel 33(2) PCT) gegenüber dem Stand der Technik, da ein Verfahren zur Bestimmung alkalischer Phosphatase offenbart wird, in dem eine neue Kombination von Haupt-und Nebenmeßwellenlängen benutzt wird.

2. Artikel 33(3) PCT

2.1. Die **Ansprüche 1-11** sind aus folgenden Gründen erfinderisch (Artikel 33(3) PCT) gegenüber D1 und D3:

Der Gegenstand der Ansprüche 1-11 unterscheidet sich vom nächsten Stand der Technik D1 dadurch, daß neben der Hauptmeßwellenlänge von 450 +/- 10nm "als Nebenmeßwellenlänge mindestens eine der Wellenlängen 480 +/- 10nm, 546 +/- 10nm oder 575 +/- 10nm verwendet" wird.

Die spezielle Kombination der beanspruchten Wellenlängen hat den überraschenden Effekt gegenüber dem Stand der Technik, daß sich bei der Bestimmung alkalischer Phosphatase die Verwendung von Peroxidase zur Beseitigung von Störungen durch freies Hämoglobin erübrigt.

Diese Auswahl der Wellenlängen und der damit verbundene Effekt ist aus D1 und D3 nicht naheliegend:

D1 offenbart vielmehr Bereiche starker Absorption von Hämoglobin, d.h. Bereiche großer Störung durch Hämoglobin, in denen auch die beanspruchten Bereiche liegen: 380-450nm oder/und 520-590nm (Seite 2, Zeilen 13-16, Zeilen 57-58). D3 offenbart Absorptionsmaxima bei ca. 540 und 575nm für Hämoglobin. Das Problem der Entstörung wird in beiden Dokumenten ausschließlich mit Hilfe von Peroxiden gelöst (D1, Anspruch 6, D3: Zusammenfassung).

Punkt VIII:

Die Ansprüche 1 und 10 wurden zwar als getrennte, unabhängige Ansprüche abgefaßt, sie scheinen sich aber tatsächlich auf ein und denselben Gegenstand zu beziehen und unterscheiden sich voneinander offensichtlich nur durch voneinander abweichende Definitionen des Gegenstandes, für den Schutz begehrt wird. Somit sind die Ansprüche nicht knapp gefaßt.

Aus diesem Grund erfüllen die Ansprüche 1 und 10 nicht die Erfordernisse des Artikels 6 PCT.

Fall von enzymatischen Farbtests wie beispielsweise zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase, bei denen die Hauptmeßwellenlänge im Bereich von 415 nm liegt, nicht möglich.

Im US-Patent 5,766,872 wird erwähnt, daß bei der Amylase-Bestimmung die Nebenwellenlänge von 577 nm zu einer Verringerung der Hämolysestörung führt. Aus den angeführten Meßdaten ist jedoch zu erkennen, daß bereits bei einem Hb-Gehalt von 500 mg/dl eine signifikante Meßwertabweichung von bis zu 8 % vorliegt. Das reicht zwar für die Hämolyse-Entstörung, doch ist aufgrund der verwendeten Hauptmeßwellenlänge von ca. 415 nm zu erwarten, daß bei höherem Hb-Gehalt (wie er bei einer Therapie mit Blutersatzmitteln auftritt) diese Meßwertabweichung ebenfalls größer wird und eine ausreichende Hb-Entstörung dann nicht mehr gegeben ist.

In der DE-A-196 28 484 wird ein Verfahren zur Beseitigung von Störungen, die durch die Anwesenheit von freiem Hämoglobin hervorgerufen werden, beschrieben. Die Hämoglobin-Störung bei Photometrischen Messungen wie beispielsweise der Bestimmung von alkalischer Phosphatase wird dadurch beseitigt, dass der zu vermessenen Probe peroxidische Verbindungen zugesetzt werden. Dadurch kommt es zu einer raschen Ausbleichung der vom Hämoglobin verursachten Färbung und Wegfall der damit verbundenen spektralen Störungen. Die Messung der mit Peroxid behandelten Probe erfolgt bei Wellenlängen von etwa 380-450nm und/oder 520-590nm. Die Bestimmung von alkalischer Phosphatase ohne Peroxid-Behandlung wird weder offenbart noch nahegelegt.

Im Stand der Technik ist kein Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase ohne Peroxid-Zugabe bekannt, das auch in Anwesenheit von hohen Hb-Konzentrationen, wie sie beispielsweise in Blutersatzmittel enthaltenden Proben vorkommen, störungsfrei durchgeführt werden kann.

Aufgabe war es daher, ein verbessertes Verfahren zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase in einer Probe zu entwickeln, das die Nachteile des Standes der Technik weitgehend überwindet. Insbesondere sollte ein einfaches und anwenderfreundliches Verfahren

zur Beseitigung von Störungen durch Hämoglobin und auf Hämoglobin basierenden Blutersatzmitteln bei der Bestimmung der alkalischen Phosphatase bereitgestellt werden.

Gelöst wird die Aufgabe durch das in den Ansprüchen näher definierte Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase in einer Probe durch optische Messung. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man eine Hauptmeßwellenlänge von 450 ± 10 nm und als Nebenmeßwellenlänge mindestens eine der Wellenlängen 480 ± 10 nm, 546 ± 10 nm oder 575 ± 10 nm verwendet. Bevorzugt wird nur eine der genannten Nebenmeßwellenlängen verwendet.